

鯉節黴の生化学的研究-I*

抗菌性について

齊藤 要・鮫島宗雄

Biochemical Studies on the Mould Isolated from Katsuobushi - I

On the Antibiotic Action of the Mould

Kaname SAITŌ and Muneo SAMESHIMA

緒 言

鯉節は我国独特の水産加工食品であるが、その製造工程の一つとして行う「黴付け」の意義については従来より種々論議されて居り、一般には優良黴の繁殖により鯉節の水分除去・脂肪分解が行われ品質を向上するとされ、蛋白質分解・アミノ酸其の他の呈味成分の増減に関しては研究者により意見が異り未だ結論を得ない状態である⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁵⁾。最近小幡・俣野氏⁽⁴⁾は鯉節特有の香氣は黴付けにより発生する事を発表して居る。これに反して中沢氏等⁽⁶⁾は鯉節の風味改善には黴付けを絶対には必要としないとし、その意義の一つとして常識的に黴の繁殖により他の有害菌の侵入を防ぐ点を挙げて居るが、我々は鯉節優良黴の数種の細菌に対する作用につき実験的検討を加え抗菌性と黴付けの意義について若干の知見を得たので其の結果を報告する。

実 験 の 部

供試鯉節黴：実験に当り試料に供した黴は、現兵庫農大吉村貞彦教授が鹿児島産鯉節より分離した優良黴28株中より *Aspergillus ruber* 及び *A. repens* に属する数株を使用した。これらの黴は28°Cを生育の適温としCZAPEK培地中に於て色素を生産し、その色は *A. ruber* No.9(吉村教授分離番号以下同)は濃赤色、同No.1及びNo.6は赤と黄の中間色、又 *A. repens* No.26は黄色である。

供試細菌：抗菌性の検索に当り使用した細菌は下記の通りである。

- | | |
|---------------------------------------------------|-------|
| 1) <i>B. subtilis</i> No. 1 | 3,022 |
| 2) <i>B. mesentericus fuscus</i> FLUGGE 94 | 3,033 |
| 3) <i>Microc. pyogenes var. aureus</i> ROSENBAACH | 3,184 |
| 4) <i>E. coli</i> MIGULA CAST et ch | 3,014 |
| 5) <i>Proteus vulgaris</i> HAUSER | 3,045 |
| 6) <i>B. subtilis</i> (A) | |
| 7) " (B) | |
| 8) <i>E. coli</i> (C) | |

(註) 1)~5)は醸酵研究所より分離の菌で番号は同所の整理番号

* 1953年11月4日、日本水産学会秋季大会(津)にて発表。

6)~7) は本学部細菌学教室保有菌 () 内は仮番号

I. 培養液の抗菌性

先ず *A. ruber* No. 6 及び No. 9, *A. repens* No. 26 を 100 cc 容フラスコに 15 cc ずつ分注した CZAPEK 液に接種, 28°C-23 日間培養後濾過しその培養濾液が細菌に対し抗菌性を有するか否かを実験した。

使用培地: 培養濾液 0, 20, 及び 50% 含有のペプトン水を使用した, ペプトン水は殺菌後培養濾液を添加した際全容が 5 cc となり且つ培養濾液添加量に関せずペプトン 1% 及び NaCl 0.5% を含有する様調整し試験管に分注した. 0% 添加は対照試験である。

検定方法: 上記の培地に, 普通肉汁に 36°C-24 時間培養した *B. subtilis* (A) を 1 白金耳ずつ接種し, 36°C 下に培養し 12, 24 及び 72 時間後に付き細菌の発育を濁濁度により観察した. この結果は Table. 1 の如くである。

Table 1. Antibiotic activity of the culture liquor for *B. subtilis* (A)

Volume of culture liquor (in peptone water 5 cc)	<i>A. ruber</i> (No. 6) (finale pH 5.4)			<i>A. ruber</i> (No. 9) (finale pH 6.0)			<i>A. repens</i> (No. 26) (finale pH 5.6)		
	12	24	72hr.	12	24	72hr.	12	24	72hr.
0 (control)	+	卍	卍	+	卍	卍	+	卍	卍
20 %	+	卍	卍	-	-	-	-	-	-
50 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : degree of turbidity

一般に培養中の CZAPEK 液の pH は鰹の発育と共に酸性となる傾向が認められるが pH 自体の菌の発育に及ぼす影響については対照試験で充分考慮した. *A. ruber* No. 9, *A. repens* No. 26 は共に 20% の添加により細菌の発育を完全に阻止する事が出来たが, *A. ruber* No. 6 添加には発育が認められ, 50% 添加では何れも発育を完全に阻止する事が出来た. 元来鰹の抗生物質の生産は培養基の種類によつて異なるものであるが, 以上の結果より供試鰹の CZAPEK 培養液自体に抗菌性が認められたのである。

II. 鰹節エキスの抗菌性

以上は人工培地による実験で実際の鰹節製造の条件とは異なるものである. 即ちその製造操作より考えて煮熟, 焙干, 日乾による防腐効果が考えられるが, 更に鰹付けによる防腐効果の一端を知る為同一処理の生節を使用し次の実験を行った。

一ヶ月間試験管内で *A. ruber* No. 9 及び *A. repens* No. 26 鰹付けした生節片と, 同

Table 2. Antibiotic activity of extracts from moulding-katsuobushi

Bacteria	Control (pH 6.0)			<i>A. ruber</i> (No. 9) (pH 6.4)			<i>A. repens</i> (No. 26) (pH 6.4)		
	15	24	72hr.	15	24	72hr.	15	24	72hr.
<i>B. subtilis</i> (A)	+	卍	卍	+	+	卍	+	卍	卍
<i>B. subtilis</i> (B)	+	卍	卍	+	+	卍	+	+	卍
<i>E. coli</i> (C)	+	卍	卍	+	卍	卍	+	卍	卍

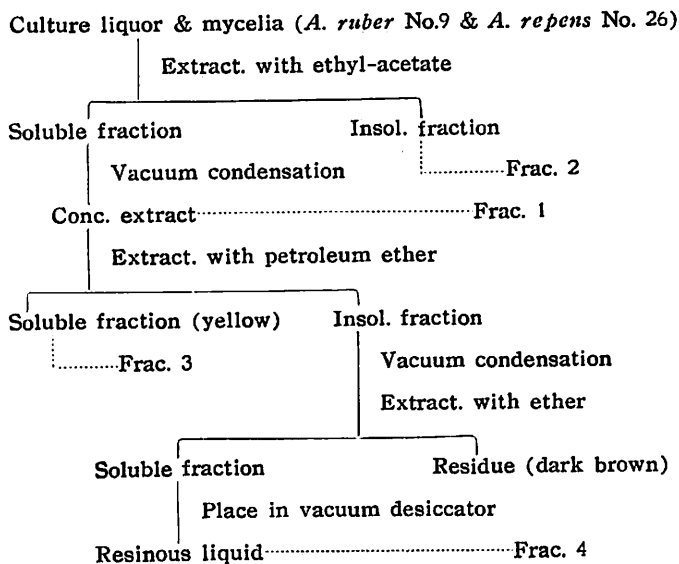
+ : degree of bacterial growth (turbidity)

じく微付けしないものの表面を削り取り、それらの20倍浸出液5ccづつを培養基とし *B. subtilis* (A) 及び (B), 並びに *E. coli* (C) を接種培養した結果は Table. 2 の如くである。

即ち微付けした方が *B. subtilis* の発育を多少遅らせる事実を観察したが其の作用はあまり顕著ではない。実際問題として鯉節の如き水分含量の少ない製品は細菌による腐敗は起り難いものであるから微付けによる防腐効果の有無はあまり問題にならないと思う。

III. 有効区分の分別

Fig. 1. Extraction of coloring matters—1



前述の如く微の CZAPEK 培養液に抗菌性が認められたので有効区分の分別を試みた。*A. ruber* No.9 及び *A. repens* No. 26 を 1.000 cc 容フラスコに 150 cc づつ分注した CZAPEK 液に接種 28°C—30 日間培養後、培養液及び菌体を濾過により分ち Fig. 1 の如くして醋酸エチル可溶区分 (Frac. 1), 同不溶区分 (Frac. 2), frac. 1 の石油エーテル可溶区分 (Frac. 3) 及び同不溶区分のエーテル可溶区分 (Frac. 4) に分別したが醋酸エチル及びエーテル可溶区分の収量は Table. 3 の如くである。

Table 3. Yield of earch fractions

Mould	Culture liquor (mg/dl)		Mycelia (mg/g)	
	Frac. 1	Frac. 4	Frac. 1	Frac. 4
<i>A. ruber</i> (No. 9)	15.7	6.5	89.1	29.1
<i>A. repens</i> (No. 26)	18.8	6.4	133.7	43.6

A. ruber No. 9 の Frac. 1 は暗赤色樹脂状 *A. repens* のそれは黄褐色で又 Frac. 4 もそれぞれ同様の外観を呈して居た。

IV. 抽出区分の抗菌性及び抗黴性

抽出区分の抗菌性を定性的に知る為に次の如き実験を行つた。即ち各区分溶液 (Fig. 1 Frac. 1, 2 及び 3) に直径 17 mm の円形濾紙を浸漬し、それを乾燥後供試細菌を流し込んだ普通肉汁寒天平板上に付け 3°C-12 時間後濾紙を取り去り直ちに 36°C-24 時間培養し、濾紙添付個所の周囲に生ずる細菌発育阻止帯 (透明円形) の直径を測定した。その一例を挙げると Table. 4 の如くである。

Table 4. Antibiotic activity of each extract fractions of *A. ruber* No. 1 & No. 9 mycelia

Bacteria	Activity			Fraction 1's Inhibition zone (Dia. mm)	
	Frac. 1	Frac. 2	Frac. 3	No. 1	No. 9
<i>B. subtilis</i>	+	-	-	20	27~28
<i>B. mesentericus</i>	+	-	-	19	24~27
<i>M. pyogenes aureus</i>	+	-	-	18~19.5	20~21
<i>E. coli</i>	±	-	-	0	17
<i>P. vulgaris</i>	-	-	-	0	0
<i>B. subtilis</i> (A)	+	-	-	18~20	20~21
<i>B. subtilis</i> (B)	+	-	-	18~19	20
<i>E. coli</i> (C)	-	-	-	0	0

抗菌性区分は醋酸エテル可溶部分で、他の2区分には認められなかつた。又細菌菌種に対しては *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *M. aureus* の GRAM 陽性菌を強く抑制する傾向が認められた。以上の定性的な結果は菌体のみならず培養液の抽出区分でも又 *A. repens* No. 26 の場合もほぼ同様である。

抽出区分の抗黴性について見ると、優良黴培養中往々にして雑黴が混入し旺盛に発育する事は著者等のしばしば経験した事実であるが、前述の如く抽出区分を渗透乾燥させた濾紙を CZAPEK 寒天平板に添付し *Rhizopus Delemar* 及び過去の研究で不良黴と言われる *A. melleus* に対し Cross streak spectrum 法⁽⁶⁾により実験した所では発育阻止は認められなかつた。経節の如き水分含量の少い製品では腐敗菌よりも不良黴の発育防止が望ましい事と思われるが、本実験の範囲内では其の作用は認められなかつた。

V. 有効区分の抗菌性

次に有効区分である菌体及び培養液の醋酸エテル及びエーテル抽出の2区分について *B. subtilis* (A) 及び (B) と *E. coli* (C) に対する最少有効濃度を知る為に下記の実験を行つた。

抽出区分 100 mg につき 0.5 cc の割合で醋酸エテル又はエーテルを加えて溶解せしめ、これを水で各種濃度に稀釈して試料とした。この 1 cc を試験管に各 5 cc 分注せる使用培地ペプトン水に添加し、供試細菌を 1 白金耳づつ接種し 36°C-24 時間培養後に於ける発育完全阻止有効濃度を濁濁度により観察した。対照としては試料の代りに醋酸エテル又はエーテルを同様に加えたものを使用して実験を行つた。其の結果は Table. 5 の如くである。

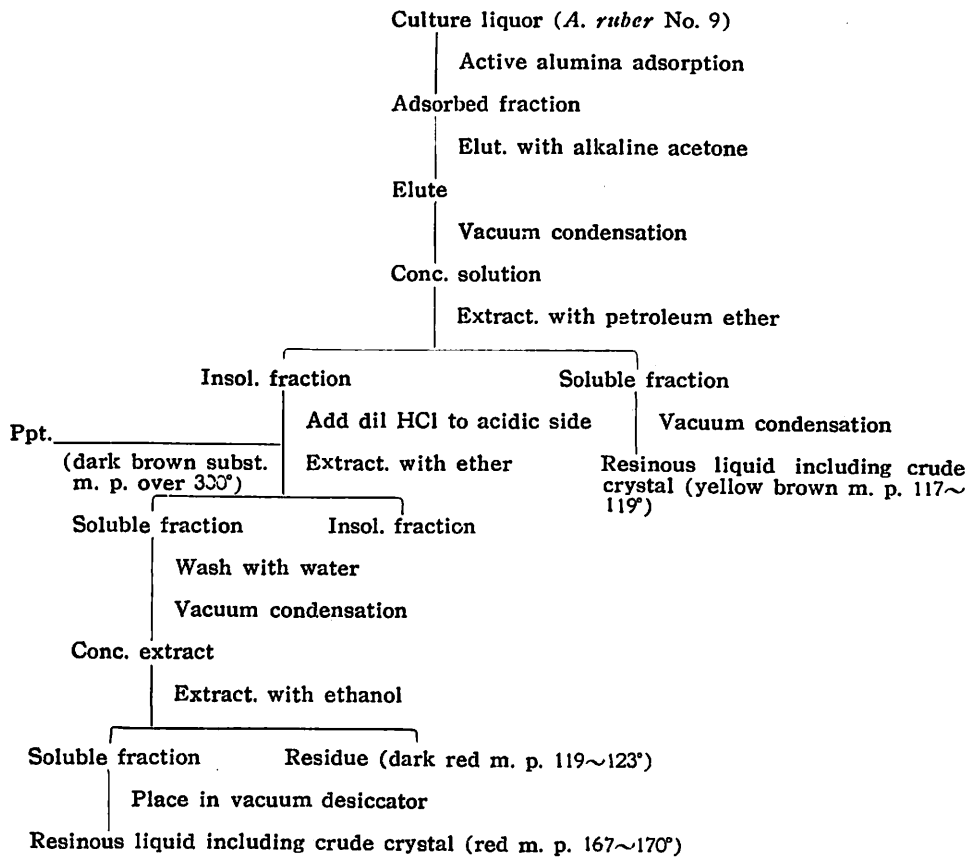
即ち本実験の範囲内では両区分の抗菌力の差又は *A. ruber* No. 9 及び *A. repens* No.

Table 5. Antibiotic activity of coloring matter fractions for bacteria (mg/ml)

Bacteria	Culture liquor		Mycelia	
	ethyl-acetate extract	ether extract	ethyl-acetate extract	ether extract
<i>B. subtilis</i> (A)	0.08	0.08	0.018	0.016
<i>B. subtilis</i> (B)	0.016	0.08	0.018	0.016
<i>E. coli</i> (C)	0.8	0.8	0.9	0.03
<i>B. subtilis</i> (A)	0.02	0.02	0.1	0.08
<i>B. subtilis</i> (B)	0.02	0.02	0.1	0.08
<i>E. coli</i> (C)	1.0	1.0	0.1	0.8

26 の各抽出物間の抗菌力の差は明らかではないが、其の有効濃度は *E. coli* に対しては 1/1,000~1/10,000, *B. subtilis* に対しては 1/10,000~1/100,000 の間に存する結果を得た。

Fig. 2. Extraction of coloring matters—2



VI. 有効成分の分離精製

有効成分の分離精製予備実験として *A. ruber* No. 9 の培養濾液につき Fig. 2 に示す

如きアルミナ吸着法を試み、図示せる如き m.p. を有する粗結晶を分離したが之等の抗菌性及び化学的性質については次の機会に発表する。

要 約

以上の如く鯉節から分離された優良黴の抗菌性を検討した所 *A. ruber* 及び *A. repens* に属する株の CZAPEK 培養液が *B. subtilis* に対し抗菌性を有する事を知り、又黴付け鯉節のエキスは生節エキスに比べ若干の抗菌性が認められた。その抗菌性は醋酸エチル並びにエーテル抽出区分に移り、*E. coli* に対してはペプトン水中 1/1,000~1/10,000 の間に発育完全阻止濃度を有するが *B. subtilis* に対しては 1/10,000~1/100,000 の間に有する事を認めた。其の抗菌性は又 *B. mesentericus*, *M. pyogenes aureus* にも有効で一般に GRAM 陽性菌に対し強く認められ、*P. vulgaris* 及び黴の *Rhizopus Delemar*, *A. melleus* の発育阻止には効力がない様に思われる。又有効区分より数種の粗結晶を分離した。

終りに臨み試料の提供及び御指導を賜わつた兵庫農科大学吉村教授に深甚の謝意を表する。

Résumé

The authors researched into the antibiotic activity of the excellent mould isolated from "Katsuobushi", summarizing the results in Table 1~5, Fig. 1~2, observing the following phenomena.

In Czapek solution some strains of *A. ruber* and *A. repens* produced the antibiotic substance inhibiting the growth of *B. subtilis* and other bacteria. This antibiotic substance was removed from the culture-fluid and mycelia to ethyl-acetate and ether soluble fraction. Those fractions showed an inhibitory power against the growth of *B. subtilis* at the dilution of 1:10,000~100,000 and against *E. coli* at that of 1:1,000~10,000. Generally, the power of this substance against the growth of Gram positive bacteria (i.e. *B. mesentericus*, *M. pyogenes aureus*) was more effective than that against Gram negative bacteria (i.e. *P. vulgaris*).

In manufacturing "Katsuobushi", it is desirable that the antibiotic power is effective to the injurious fungi rather than to bacteria, but within the scope of these studies, the antibiotic power of the excellent mould against *Rhizopus Delemar* and *A. melleus* was not recognized.

By applying the liquid chromatography upon the column of the active alumina, we separated several kinds of crude crystals from the effective fraction.

文 献

- (1) 奥田：水産化学，興文社，310 (1933).
- (2) 奥田，大谷：水産食品製造化学，厚生閣，127 (1951).
- (3) 森，橋本：水産利用学，朝倉，149 (1951).
- (4) 小幡，俣野：日水誌，19，(3) 151 (1953).
- (5) 中沢，武田，末松：農化誌，10，(11) 1137 (1934).
- (6) 黒屋：化学の領域，5，550 (1951).